

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

20 Offenlegungsschrift  
21 DE 4011991 A1

21 Aktenzeichen: P 40 11 991.2  
22 Anmeldetag: 12. 4. 90  
23 Offenlegungstag: 18. 10. 90

51 Int. Cl. 5  
G 01 N 33/68  
G 01 N 27/447  
C 12 N 15/63  
C 12 P 19/34

DE 4011991 A1

30 Unionspriorität: 31 32 33  
12.04.89 JP 1-90844

34 Anmelder:  
Hitachi, Ltd., Tokio/Tokyo, JP

36 Vertreter:

Pagenberg, J., Dr.jur., Frohwitter, B., Dipl.-Ing.,  
Rechtsanwälte; Geißler, B., Dipl.-Phys.Dr.jur., Pat.-  
u. Rechtsanwälte; Kowal-Wolk, T., Dr.jur., Rechtsanwalt;  
Bardehle, H., Dipl.-Ing.; Dost, W., Dipl.-Chem.  
Dr.rer.nat.; Altenburg, U., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte,  
8000 München

37 Erfinder:  
Kambara, Hideki, Hachioji, Tokio/Tokyo, JP

38 Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung

Ein Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung kann wirkungsvoll DNA-basensequenzen von vielen Proben bestimmen, jeweils dadurch, daß die Proben simultan im Gemisch verarbeitet werden können, einschließlich eines Schritts in dem eine Vielzahl von DNA-Proben mit jeweils unterschiedlichen Vektoren kloniert wird, einen Schritt, in dem die erhaltenen Proben im Gemisch mit Primern komplementärketten-synthetisiert werden, entsprechend den jeweiligen Vektoren, wobei die Primer nur mit einem besonderen der Vektoren einzeln hybridisiert werden können, und wobei die Primer mit jeweils unterschiedlichen Fluorophoren markiert sind, einen Schritt in dem jede der erhaltenen behandelten Mischungen in vier Teile geteilt wird und wobei die DNA-Fragmentgruppen so gebildet werden, daß Endgruppen davon Adenin, Cytosin, Guanin bzw. Thymin werden können und einen Schritt, in dem die vier DNA-Fragmentgruppen, klassifiziert durch Endgruppen, auf Elektrophoresebahnen individuell unterschiedlich elektrophoretisch bewegt werden, und Fluoreszenzlicht, emittiert von den DNA-Fragmenten jeder DNA-Fragmentgruppe nachgewiesen wird.

DE 4011991 A1





5

die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Adenin ist. Insbesondere ist die DNA-Fragmentgruppe A eine Gruppe, in der die Endgruppen der DNA-Probe, die mit den Vektoren hybridisiert wurde, Adenin sind. Sie beinhaltet 5-9-A, 6-10-A, 7-11-A und 8-12-A, gezeigt in Fig. 1. Die Gruppe C (oder C-Familie) ist die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Cytosin ist. Insbesondere ist das DNA-Fragment der Gruppe C eine Gruppe, in der die Endgruppen der DNA-Proben, die mit den Vektoren hybridisiert sind, Cytosin sind. Sie beinhaltet 5-9-C, 6-10-C, 7-11-C und 8-12-C, gezeigt in Fig. 2. Die Gruppe G (oder G-Familie) ist die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Guanin ist. Insbesondere ist die DNA-Fragmentgruppe G eine Gruppe, in der die Endgruppen der mit den Vektoren hybridisierten DNA-Proben, Guanin sind. Sie beinhaltet 5-9-G, 6-10-G, 7-11-G und 8-12-G, gezeigt in Fig. 2. Die Gruppe T (oder T-Familie) ist die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Thymin ist. Insbesondere ist die DNA-Fragmentgruppe T eine Gruppe, in der die Endgruppen der mit den Vektoren hybridisierten DNA-Proben, Thymin ist. Sie beinhaltet 5-9-T, 6-10-T, 7-11-T und 8-12-T, gezeigt in Fig. 2.

In Fig. 3, in der die Elektroforesevorrichtung vom Mehrfarben-Fluoreszenznachweissystem veranschaulicht ist, enthält eine Elektroforesestrengelplatte 110 Polyacrylamid einer Konzentration von 6%, gebildet in einem 0,3 mm Raum zwischen Quarzplatten von 200 mm x 300 mm (nicht gezeigt). Es sollte angemerkt werden, daß die Konzentration des Polyacrylamids hierin angegeben wird als dessen totale Monomerkonzentration in % Gewicht pro Volumen (g/ml). Die Elektroforesestrengelplatte 110 hat Probeninjektionstaschen 112, 113, 114 und 115. Die Probeninjektionstaschen tragen die DNA-Fragmentgruppen A, C, G und T jeweils dort hineingetroffen durch eine Injektionsschablone bzw. Spritze, um diese wandern zu lassen. Die Elektroforesestrengelplatte 110 hat einen durch eine Seitenfläche derselben auf einen Abschnitt etwa 25 cm unterhalb des Bodens der Taschen gerichteten Laserstrahl 123, zu dem die DNA-Fragmentgruppen wandern, und zwar unter Verwendung einer Laserstrahlquelle 116. Dies bewirkt, daß die DNA-Fragmentgruppen Fluoreszenzlicht emittieren. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch ein Prisma (nicht gezeigt) geteilt und Spektren verschiedener Wellenlängen, die unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen der Proben 5 bis 8 entsprechen, werden durch optische Bandpassfilter erhalten. Diese Fluoreszenzspektren werden auf einen Fokussierungsteil eines zweidimensionalen Fluoreszenzlichtdetektors 117 fokussiert, um Fluoreszenzlichtabbildungen entsprechend den Proben 5 bis 8 zur Verfügung zu stellen.

Die Fluoreszenzlichtabbildungen, die auf den Fokussierungsteil des zweidimensionalen Fluoreszenzlichtdetektors 117 fokussiert sind, können durch einen Bildschirm 121 als vier Linienbilder 122 entsprechend dem jeweiligen Proben 5 bis 8 wiedergegeben werden. Zur gleichen Zeit können die Fluoreszenzlichtbilder durch eine Anzeige 120, durch eine Steuerung 118 und eine Datenverarbeitungseinheit 119 wiedergegeben werden. Fig. 4 zeigt eine vergrößerte Abbildung der Linienbilder 122, die auf dem Bildschirm 121 abgebildet werden. Die vier Linienbilder entsprechen den jeweiligen Proben 5 bis 8 abwärts. Die Flächen A, C, G und T, angezeigt durch Punktlinien sind Flächen, die den jeweiligen DNA-Fragmentgruppen A, C, G und T jeder der Probe entsprechen. Die auf diese Weise erhaltenen Daten können arithmetisch verarbeitet werden, um die DNA-Ba-

sequenzen simuliert zu bestimmen.

In dieser Ausbildungsform werden als Laserstrahlquellen ein Argonlaser mit 488 nm Wellenlänge und ein He-Ne-Laser mit 543 nm Wellenlänge verwendet. Der Argonlaser und der He-Ne-Laser können in einer Einheit integriert werden, um den gleichen Abschnitt oder unterschiedliche Abschnitte zu bestrahlen, die 2 mm oder mehr beabstandet sind. Für die Anregung von FITC und NBD-F der markierenden Fluorophore wird der Argonlaser verwendet, für die Anregung von TRITC und Texas-Rot wird der He-Ne-Laser verwendet. Für große Probenanzahlen können zusätzliche Fluorophore mit längeren Wellenlängen verwendet werden. Für die zusätzlichen Fluorophore kann ein weiterer He-Ne-Laser mit 633 nm Wellenlänge oder ein Halbleiterlaser verwendet werden.

Die oben beschriebene Ausführungsform läßt deutlich erkennen, daß das erfindungsgemäße Verfahren in sich vorteilhaft ist, daß so viele Proben bearbeitet werden können, wie Mischungsformen selbst, wobei gleichzeitig der betriebsmäßige Aufwand reduziert werden kann. In dem Verfahren, in dem die DNA-Fragmentgruppen A, C, G und T mit verschiedenen Farben markiert sind und auf der gleichen Bahn wandern, muß die Wanderungszeitdifferenzen, bedingt durch die Farbdifferenzen korrigiert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch in dieser Hinsicht vorteilhaft, weil es keine Korrektur der Wanderungsgeschwindigkeitsdifferenzen benötigt, die durch den Unterschied der Markierungsfarbstoffe bedingt sind, da die gleiche Probe mit der gleichen Farbe markiert werden kann.

#### Patentsprüche

#### 1. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung, umfassend die Schritte:

- Klonieren einer Vielzahl von DNA-Proben mit jeweils unterschiedlichen Vektoren (1, 2, 3, 4);
- Komplementär-Ketten-Synthesieren der Proben (5, 6, 7, 8) erhalten in Schritt i) im Gemisch mit Primern (9, 10, 11, 12), entsprechend den jeweiligen Vektoren (1, 2, 3, 4), wobei die Anzahl der Primer (9, 10, 11, 12) der Anzahl der Sorten von Vektoren (1, 2, 3, 4) entspricht, jeder dieser Primer (9, 10, 11, 12) in der Lage ist, ausschließlich mit einem spezifischen dieser Vektoren (1, 2, 3, 4) zu hybridisieren, und die Primer (9, 10, 11, 12) mit Fluorophoren markiert sind, die jeweils unterschiedliche Wellenlängen haben;
- Herstellen von vier DNA-Fragmentgruppen mit jeweils vier unterschiedlichen Endgruppen aus dem behandelten Gemisch (5-9, 6-10, 7-11, 8-12) erhalten in Schritt ii); und
- elektrophoretisches Wandernlassen der vier DNA-Fragmentgruppen und Nachweis des Fluoreszenzlichts, emittiert von den jeweiligen DNA-Fragmenten in jeder DNA-Fragmentgruppe.

#### 2. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung, umfassend die Schritte:

- Klonieren einer Vielzahl von unterschiedlichen Einzelstrang-DNA-Proben, deren Basensequenz bestimmt werden soll, mit jeweiligen Vektoren (1, 2, 3, 4), unterschiedlich für jede Probe;
- Markieren der Primer, deren Anzahl der

Anzahl der Sorten von Vektoren (1, 2, 3, 4) entspricht, deren Basensequenzen unterschiedlich voneinander sind und die nur mit einem spezifischen Vektor hybridisiert werden können, und zwar mit jeweiligen Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen.

iii) Hybridisieren der Primer (9, 10, 11, 12), markiert mit den jeweiligen Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen, mit einer Vielzahl von entsprechenden Vektoren (1, 2, 3, 4) für die jeweiligen Einzelstrang-DNA-Proben (5, 6, 7, 8), kloniert mit den Vektoren (1, 2, 3, 4) derart, daß all die DNA-Proben (5, 6, 7, 8), kloniert mit den Vektoren (1, 2, 3, 4), gemischt und verarbeitet werden mit all den Primern (9, 10, 11, 12);

iv) Teilen jeder der Mischungen (5-9, 6-10, 7-11, 8-12) der Proben, verarbeitet in Schritt 3, in vier Teile;

v) Komplementär-Ketten-Synthesisieren der viergeteilten Gemische (5-9, 6-10, 7-11, 8-12) der Proben individuell, so daß Endgruppen davon Adenin, Cytosin, Guanin bzw. Thymin werden können, wobei individuell eine DNA-Fragmentgruppe hergestellt wird, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Adenin ist, eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Cytosin ist, eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Guanin ist, und eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Thymin ist; und

vi) elektrophoretisches Wandernlassen der individuellen Fluoreszenzlichts, emittiert von den DNA-Fragmentgruppen, und Trennen und Nachweisen der Proben nach ihren unterschiedlichen Emissionswellenlängen, und zwar von einer Vielzahl von DNA-Proben.

3. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung nach Anspruch 2, in dem die Trennung und der Nachweise der DNA-Fragmentgruppen derart durchgeführt wird, daß die Proben getrennt und nachgewiesen werden unter Verwendung der emittierten Wellenlängenunterschiede in jeder DNA-Fragmentgruppe, die elektrophoretisch auf den entsprechenden Wanderungsbahnen bewegt wird und zur gleichen Zeit wird die Sorte der Endgruppen spezifiziert durch die Lage der Wanderungsbahnen, an der das Fluoreszenzlicht emittiert wird, so daß eine Vielzahl von unterschiedlichen Basensequenzen einer Einzelstrang-DNA-Probe simultan bestimmt wird.

4. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung nach Anspruch 3, in dem die Proben separiert und nachgewiesen werden durch Verwendung von Fluoreszenzlichtwellenlängenunterschieden der jeweiligen DNA-Fragmentgruppen, daß emittiert wird durch das Anlegen eines Laserstrahls (123) auf Abschnitte mit bestimmten Abständen, zu denen die DNA-Fragmentgruppen auf den Wanderungsbahnen wandern.

5. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung nach Anspruch 4, in dem die Trennung und der Nachweis der Proben unter Verwendung der Fluoreszenzlichtemissionswellenlängenunterschiede der DNA-Fragmentgruppen in der Art durchge-

führt wird, daß das Fluoreszenzlicht der DNA-Fragmentgruppen mit einer Wellenlängentrennvorrichtung aufgetrennt wird und jede der getrennten Wellenlängen individuell durch einen Detektor (117) nachgewiesen wird.

6. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung nach Anspruch 5, in dem der Detektor (117) ein zweidimensionaler Fluoreszenzlichtdetektor ist.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

FIG. 2

A-Familie	5-9-A =====	6-10-A =====	7-11-A =====	8-12-A =====
C-Familie	5-9-C =====	6-10-C =====	7-11-C =====	8-12-C =====
G-Familie	5-9-G =====	6-10-G =====	7-11-G =====	8-12-G =====
T-Familie	5-9-T =====	6-10-T =====	7-11-T =====	8-12-T =====

FIG. 3

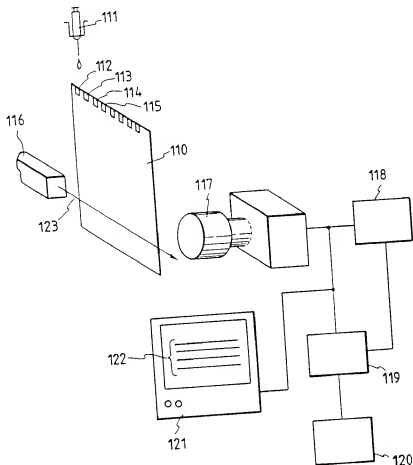


FIG. 4

	A Region	C Region	G Region	T Region
Probe 5-9				
Probe 6-10				
Probe 7-11				
Probe 8-12				



FIG. 1

